

扶正消癌方对乳腺癌患者癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响

柳言平¹ 李福广¹ 郝光军² 洪伟¹ 熊裕民¹

(1 陕西省安康市中心医院普外科,安康,725000; 2 陕西省榆林市第一医院肿瘤科,榆林,719000)

摘要 目的:探讨扶正消癌方对乳腺癌患者癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响,并研究凋亡分子机制。方法:66例乳腺癌患者随机分为对照组30例和治疗组36例,对照组患者接受化疗药物表阿霉素和环磷酰胺治疗,治疗组患者在对照组基础上加用扶正消癌方,日1剂,连服9周;2组患者治疗结束后接受手术,术中留取瘤体组织。用免疫组化法检测乳腺癌组织中Ki67、MMP2、Fas基因的表达水平,Western blotting分析凋亡分子Bax、Bcl-2的蛋白表达情况。结果:治疗组乳腺癌组织Fas阳性率明显高于对照组($P < 0.05$);治疗组乳腺癌组织Ki67、MMP2的阳性表达率明显低于对照组;Western blotting结果显示治疗组乳腺癌细胞Bax蛋白表达显著多于对照组,而Bcl-2蛋白表达明显少于对照组,差异比较均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:扶正消癌方可抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭转移,促进癌细胞凋亡,这可能是扶正消癌方治疗乳腺癌的作用机制。

关键词 扶正消癌方;乳腺癌;Ki67;MMP2;Fas;凋亡

Effects of Fuzheng Xiaoi Decoction on Cell Proliferation, Invasion and Apoptosis in Tissues of Breast Cancer

Liu Yanping¹, Li Fuguang¹, Hao Guangjun², Hong Wei¹, Xiong Yumin¹

(1 Department of General Surgery, Central Hospital of Ankang City of Shaanxi Province, Ankang 725000, China;

2 Department of oncology, Yulin First Hospital, Shaanxi Province, Yulin 719000, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Fuzheng Xiaoi Decoction on cell proliferation, invasion and apoptosis in tissues of breast cancer, and its relevant apoptotic molecular mechanisms. **Methods:** A total of 66 cases of breast cancer were randomly divided into the control group (30 cases) and the treatment group (36 cases). The control group received chemotherapy drugs doxorubicin and cyclophosphamide. On the basis of the control group, the treatment group were treated with Fuzheng Xiaoi Decoction once a day for nine weeks. Ki67, MMP2 and Fas protein expression levels were determined by immunohistochemical technology. The protein levels of Bax, Bcl-2 were detected by western blotting. **Results:** The Fas expressions of breast cancer tissues were significantly higher in treatment group than the control group ($P < 0.05$). The Ki67, MMP2 expressions in breast cancer tissues were lower in treatment group compared with the control group ($P < 0.05$). Results of western blotting indicated that the protein level of Bax in breast cancer tissues of the treatment group increased significantly compared with the control group, but the Bcl-2 expression level decreased significantly, the differences were statistically significant (both $P < 0.05$). **Conclusion:** Fuzheng Xiaoi Decoction can inhibit the proliferation and invasion breast cancer cells, promote the apoptosis of breast cancer cells, which may be the molecular mechanism of Fuzheng Xiaoi Decoction in the treatment of breast cancer.

Key Words Fuzheng Xiaoi Decoction; Breast cancer; Ki67; MMP2; Fas; Apoptosis

中图分类号:R273 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.014

乳腺癌为临床常见的恶性肿瘤,发病率高,已转移,目前主要治疗方式包括外科手术、化疗、放疗和内分泌治疗等^[1-3]。中西医结合治疗乳腺癌疗效显著^[4-5],中药复方扶正消癌方联合西药治疗中晚期乳腺癌患者疗效满意^[6],且能改善乳腺癌术后内分泌综合征症状,提高患者生活质量^[7],但未见相关分子机制研究,为进一步探讨扶正消癌方治疗乳腺癌的机制,本研究观察扶正消癌方用药后对乳腺癌组织

中细胞核增殖抗原ki-67、肿瘤侵袭转移促进因子MMP2及促细胞凋亡因子Fas表达的影响,还对其凋亡分子机制进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2014年1月至2015年6月安康市中心医院普外科收治,经组织活检及病理学检查诊断为乳腺癌的患者66例,均为女性,所有患者病理分期TNM分期 $\geq$ Ⅱ期,生存期预计 $\geq$ 8个

基金项目:陕西省科技计划项目(编号:2013KJXX-78)

作者简介:柳言平(1980.12—),男,硕士,主治医师,主要从事中医外科临床与研究工作,E-mail:liu6668486@sohu.com

通信作者:郝光军(1979.03—),男,本科学历,主治医师,研究方向为肿瘤,E-mail:30244308@qq.com

月,KPS 评分 ≥ 60 分,排除其他恶性肿瘤者,接受放疗、药物过敏者。治疗组 36 例,年龄 30 ~ 65 岁,平均年龄 (48.2 ± 9.78) 岁,TNM 分期:Ⅱ期 9 例、Ⅲ期 17 例、Ⅳ期 10 例,病理分期:浸润性导管型 19 例、浸润性小叶型 13 例、腺癌型 4 例,KPS 评分 60 ~ 71 分,平均 (65.87 ± 2.24) 分。对照组 30 例,年龄 31 ~ 67 岁,平均年龄 (49.1 ± 8.72) 岁,TNM 分期:Ⅱ期 7 例、Ⅲ期 14 例、Ⅳ期 9 例,病理分期:浸润性导管型 16 例、浸润性小叶型 11 例、腺癌型 3 例,KPS 评分 61 ~ 70 分,平均 (64.36 ± 2.58) 分。2 组间患者年龄、TNM 分期、病理分期及 KPS 评分差异比较均无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 治疗方法 对照组患者仅接受化疗药物治疗,联用表阿霉素(辉瑞制药无锡有限公司生产,国药准字 X20000496)和环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司生产,国药准字 H32020857),表阿霉素以 60 mg/m^2 ,静脉注射,1 次/周;环磷酰胺以 600 mg/m^2 ,静脉注射,1 次/周,连用 2 周后停用 1 周。以 3 周为 1 个疗程,共治疗 3 个疗程。治疗组患者在对照组化疗药物基础上加用扶正消癌方^[7],药方成分包括:熟地黄 30 g、枸杞子 30 g、白花蛇舌草 30 g、太子参 30 g、半枝莲 20 g、桑椹 20 g、黄芪 20 g、菟丝子 15 g、茯苓 15 g、女贞子 15 g、白术 15 g、莪术 15 g、蒲公英 15 g、猫爪草 15 g、山药 15 g、三棱 15 g、淫羊藿 12 g,日 1 剂,常规水煎分 2 次服用,连续服用 3 个疗程,共 9 周。2 组患者治疗结束后接受乳腺癌外科手术(乳房切除术或保乳术),手术时留取肿瘤标本,所有标本均经 10% 中性福尔马林液固定,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋切片。

1.3 免疫组化及结果判定 采用免疫组化 SP 法二步操作,具体实验步骤按照试剂说明书进行,用 PBS 替代一抗作为阴性对照。采用双盲法观察阳性反应。以细胞被染成黄色或棕色为阳性细胞,随机选择 6 个高倍视野,每个视野计数 400 个细胞,计算阳性细胞数所占的百分比均值,当此均值 $> 10\%$ 即为阳性表达^[8]。免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司,鼠抗人 MMP-2 抗体购自上海太阳生物技术公司;兔抗人 Ki67 抗体、鼠抗人 Fas 抗体均购自武汉博士德生物工程公司。

1.4 Western blot 检测细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平 收集组织,充分裂解,离心收集上清,BCA 法测定蛋白浓度,按每管 $30 \text{ }\mu\text{g}$ 分装,加入上样缓冲液 $5 \text{ }\mu\text{L}$ 沸水浴高温变性,低温保存,按实验需要顺序上样、SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,孵育一抗、二抗,显

影,定影,拍照保存,用 Image Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析。组织裂解液、蛋白浓度测定试剂盒、Bax 与 Bcl-2 一抗购自南京碧云天生物技术公司, β -actin 抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购自北京博奥森生物技术公司。

1.5 统计学方法 相关统计学处理使用 SPSS 20.0 软件,组间比较计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测乳腺癌组织中 Ki67、MMP2 和 Fas 的表达 结果如表 1 所示,治疗组患者乳腺癌组织 Ki67 阳性率 41.7%,显著低于对照组 MMP2 阳性率 70.0%,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.298, P = 0.021$);MMP2 阳性率 38.9% 显著低于对照组阳性率 76.7%,差异有统计学意义($\chi^2 = 9.481, P < 0.01$);但是患者乳腺癌组织中 Fas 阳性率 61.1% 则显著高于对照组阳性率 33.3%,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.053, P = 0.024$)。乳腺癌组织中 Ki67、MMP2 和 Fas 的免疫组化蛋白表达情况。见图 1、图 2、图 3。

表 1 Ki67、MMP2 及 Fas 抗原检测阳性结果的比较

组别	例数	Ki67	MMP2	Fas
治疗组	36	15(41.7%) *	14(38.9%) *	22(61.1%) *
对照组	30	21(70.0%)	23(76.7%)	10(33.3%)
χ^2 值		5.298	9.481	5.053
P 值		0.021	0.002	0.024

注: * $P < 0.05$,与对照组比较。

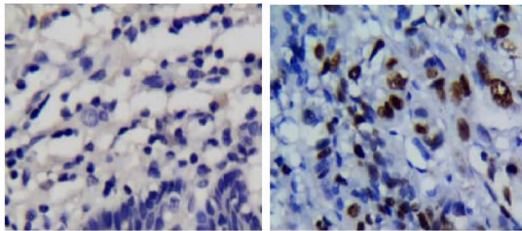


图 1 免疫组化法检测 Ki67 的细胞核表达 (左:阴性表达;右:阳性表达)

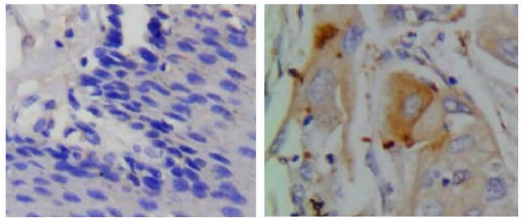


图 2 免疫组化法检测 MMP2 的细胞质表达 (左:阴性表达;右:阳性表达)

2.2 Western blotting 分析 Bax、Bcl-2 的蛋白表达 Western blotting 结果显示,与对照组比较,治疗组患

者癌组织细胞 Bax 蛋白表达显著上升, Bcl-2 蛋白表达显著下降, 差异比较均有统计学意义 ($t = 9.325, P < 0.05$)。见图 4。

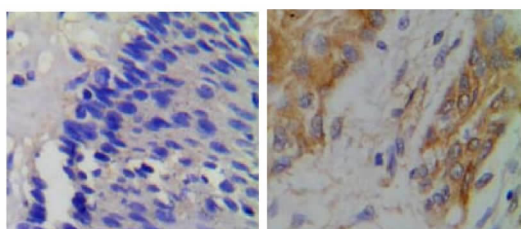


图3 免疫组化法检测 Fas 的细胞质表达
(左: 阴性表达; 右: 阳性表达)

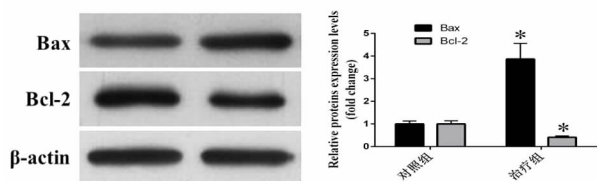


图4 Western blotting 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达

* $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨论

中医学认为乳腺癌发生与邪毒滞留、正气不足相关, 癌毒蛰伏、正气亏虚及血瘀内阻导致乳腺癌复发转移, 因此中医治疗强调扶正以祛邪、祛邪不伤正, 调整机体阴阳、气血、脏腑功能的平衡, 达到“养正积自消”之目的^[7,9-10]。扶正消癌方以桑椹、熟地黄、菟丝子、女贞子滋补肝肾之精血; 三棱、猫爪草、莪术活血散结消肿; 黄芪、山药、茯苓、太子参、白术益气健脾, 五脏得和, 精血自生; 半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英清热解毒; 淫羊藿补肾助阳^[7]。研究表明扶正消癌方临床治疗肺癌、乳腺癌、胃癌具有一定的疗效^[6,11-12]。

Ki-67 是增殖细胞核抗原, 是可靠而全面的反应细胞群体增殖活性的客观指标, 基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 可降解细胞外基质, 促进新生血管的形成, 促进肿瘤的侵袭和转移, Fas 是细胞凋亡的信号分子, 以二聚体与 Caspase-8 结合形成死亡诱导信号复合体, 最后终激活 Caspase-3 而导致表达 Fas 的靶细胞凋亡。研究表明, 薏苡仁提取物康莱特通过协同新辅助化疗下调乳腺癌患者 Survivin 和 Ki-67 表达而抑制肿瘤细胞, 提高肿瘤缓解率, 结果说明 Ki-67 在乳腺癌发生发展中扮演重要角色^[7,13]。本研究在化疗基础上联用扶正消癌方治疗乳腺癌患者, 与对照组比较可显著下调细胞增殖抗原 Ki67 的阳性表达率, 表明扶正消癌方抑制乳腺癌肿瘤细胞增殖。薯蓣丸方颗粒剂协

助化疗可降低 Ki-67 的阳性表达率, 有利于降低乳腺癌转移及复发^[13], 与本研究结果一致。

本研究结果显示, 扶正消癌方可显著上调治疗组促凋亡因子 Fas 的阳性表达率, Fas 为促凋亡基因, 治疗后 Fas 在乳腺癌组织表达增多, 凋亡促进蛋白 bax 表达上调, 而凋亡抑制因子 bcl-2 表达下调, 吴蕾等研究表明曲普瑞林导致的 bcl-2/bax 比值减小促进子宫肌细胞凋亡有关^[14], 为本研究结论提供一定支持。研究证实基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 与乳腺癌细胞转移相关^[3], 本文还研究了扶正消癌方治疗乳腺癌与肿瘤侵袭转移促进因子 MMP2 的表达关系, 结果表明, MMP2 在乳腺癌组织中的阳性表达率也明显小于对照组, 说明扶正消癌方可能对乳腺癌细胞的侵袭与转移具有一定的影响^[15]。

综上所述, 扶正消癌方通过抑制乳腺癌组织 Ki67、MMP2 基因表达降低人乳腺癌细胞的增殖和侵袭转移能力, 还通过上调 Fas、Bax 基因表达及下调 Bcl-2 表达促进人乳腺癌细胞的凋亡, 这可能是扶正消癌方治疗乳腺癌的作用机制, 但还需要通过大量的试验进行进一步验证。

参考文献

- [1] 宣雯霞, 郭泰, 王伏生. 乳腺癌的治疗进展[J]. 中国药物与临床, 2015, 15(2): 203-205.
- [2] 孙放, 郭淳, 孙行云, 等. 乳腺癌的中医治疗进展[J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(4): 87-89.
- [3] 赵建新, 林增茂, 段学宁, 等. 新辅助化疗对乳腺癌组织因子、基质金属蛋白酶-9 和蛋白酶激活受体-2 的表达及疗效的影响[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(3): 195-199.
- [4] 范洪桥, 刘丽芳, 胡金辉, 等. 中医药治疗乳腺癌临床与实验研究进展[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 178-181.
- [5] 彭博, 贺蓉, 徐启华, 等. 筋骨草提取物抑制乳腺癌转移与 MMPs 和 TIMPs 表达的关系研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3511-3514.
- [6] 王萍, 蒋益兰. 扶正消癌方干预治疗晚期乳腺癌 36 例临床观察[J]. 中医药导报, 2008, 14(5): 23, 39.
- [7] 孙献甫, 刘慧, 贺亚宁, 等. 扶正消癌方治疗乳腺癌术后内分泌综合征 50 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 192-195.
- [8] 马寅英, 杨广民, 郭玉琳, 等. 胃癌中幽门螺杆菌与凋亡相关蛋白 p53、Bcl-2、Fas 表达相关性研究[J]. 吉林医学, 2009, 30(21): 2590-2592.
- [9] 司徒红林, 陈前军, 朱华宇. 林毅教授辨治乳腺癌经验介绍[J]. 新中医, 2008, 40(7): 5-6.
- [10] 徐海虹, 童林根, 周旭东. 综合治疗提高乳腺癌术后患者生活质量的研究进展[J]. 中国医药, 2013, 8(11): 1674-1676.
- [11] 侯安继, 吴昊, 张红卫, 等. 扶正消癌方联合针刺防治老年肺癌患者化疗后肝肾功能损伤的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(10): 33-35.

(下接第 2001 页)

全面推广。

参考文献

[1] 李阳. 肺癌的中医药治疗刍议[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(5): 40-41.

[2] 赵元辰, 花宝金. 肺癌合并恶性胸腔积液的中医药治疗进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(8): 163-164, 封3.

[3] 邓生明. 中医药治疗肺癌的研究进展[J]. 中外医学研究, 2012, 10(21): 153-154.

[4] 吴翥镗, 李守然. 米逸颖治疗肺癌的临床经验[J]. 北京中医药, 2011, 30(10): 744-746.

[5] 陈婷婷, 薛锋. 中医药治疗肺癌的特点及优势[J]. 中国医药实践杂志, 2011, 1(74): 32-34.

[6] 王宪富, 马长金, 王秀清. 康莱特对肺癌切除术后肺气虚及免疫功能低下患者的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(7): 431-432.

[7] 陶丽, 王生, 赵杨, 等. 丹参素对非小细胞肺癌 A549 细胞内氧化还原状态及相关核转录因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1265-1268.

[8] 中华人民共和国卫生部医政司. 中国常见恶性肿瘤诊治规范[M]. 2 版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999: 16-21, 10-15.

[9] 钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 425, 625, 638.

[10] 佩文. 肺癌综合诊疗学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 557.

[11] Gabriovich DI, et al. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer[J]. Clinic Cancer Research, 1997, 3: 483-490.

(上接第 1996 页)

[12] 侯安继, 顾魏峰, 孙行家, 等. 扶正消癌 I 号方结合最佳支持疗法治疗晚期胃癌近期疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(5): 51-52.

[13] 林金棠, 谢甦, 李丽红, 等. 薯蓣丸对化疗期间乳腺癌患者减毒增效作用的临床研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(10): 1540-1542.

[12] Ysupa, Shield PG. Etiology of cancer: Chemical factors. In: DeVita VTJr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: Principles and Practice of Oncology [M]. 5th Ed, Philadelphia. Lippincott—Raven, 1997: 185.

[13] Strand TE, Rostad H, Damhuis RA, et al. Risk factors for 30-day mortality after resection of lung cancer and prediction of their magnitude[J]. Thorax, 2007, 62(11): 991-997.

[14] 孙思庆, 朱晓莉, 黄静, 等. 康莱特联合化疗对晚期非小细胞肺癌患者生活质量改善的临床对照研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2012, 27(5): 506-510.

[15] Rakovich G, Bussieres J, Frechette E. Postpneumectomy syndrome [J]. MMCTS, 2009, 8: 3475.

[16] 刘萍. 康莱特注射液对提高老年晚期肺癌患者生活质量的临床观察[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(9): 1712-1713.

[17] 蒋立峰, 刘延庆. 中医药治疗化疗致骨髓抑制的研究评述[J]. 中医学报, 2011, 26(5): 526-529.

[18] Chen HS, Chen J, Cui DL, et al. Effects of a Shuangling Fuzheng anticancer preparation on the proliferation of SGC-7901 cells and immune function in a cyclophosphamide-treated murine model [J]. World J gastroenterol, 2007, 13(48): 6575-6580.

[19] 顾勤花, 沈琦斌, 李冬, 等. 非小细胞肺癌化疗的研究进展[J]. 中国医药, 2013, 8(12): 1811-1812.

[20] 郝利国, 申宝忠, 李任飞, 等. 中晚期非小细胞肺癌联合治疗进展[J]. 中国全科医学, 2012, 15(33): 3812-3815.

[21] 陈友云. 康莱特注射液改善晚期肺癌患者恶液质症状(附 42 例)[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(2): 306-307.

(2016-05-26 收稿 责任编辑: 王明)

[14] 吴蕾, 张瑞红, 申彩云, 等. 曲普瑞林对子宫肌瘤及内膜组织 ER、PR、bcl-2、bax 的影响[J]. 武警医学, 2011, 22(1): 45-47.

[15] 方瑜, 杨柳青, 王松林, 等. 扶正抗癌方对 H22 移植瘤小鼠凋亡和端粒酶表达影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2013, 34(10): 1423-1425.

(2016-05-24 收稿 责任编辑: 王明)